



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, C07K 14/47, 16/40, C12N 5/06, 9/64, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/05290</p> <p>(43) 国際公開日 1999年2月4日 (04.02.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03324</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月24日 (24.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/213969 1997年7月24日 (24.07.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>鶴岡伸夫(TSURUOKA, Nobuo)[JP/JP] ✓ 〒567-0827 大阪府茨木市稲葉町18-7-501 Osaka, (JP)</p> <p>山城恭子(YAMASHIRO, Kyoko)[JP/JP] ✓ 〒569-0852 大阪府高槻市北柳川町15-13-211 Osaka, (JP)</p> <p>山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] ✓ 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASE ✓</p> <p>(54) 発明の名称 新規セリンプロテアーゼ</p> <p>(57) Abstract A serine protease or peptide fragments thereof having an amino acid sequence identical with that of serine protease as shown in SEQ ID NO: 6 or amino acid sequences derived therefrom by deletion or substitution of a part of the same or addition of one or more amino acids thereto.</p>		

(57)要約

配列番号 6 に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に 1 乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

新規セリンプロテアーゼ

技術分野

本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードするDNA、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっている (Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。

近年、中枢神経系においてもセリンプロテアーゼが生理的に重要な機能分子として働いていることが確認されるようになった。例えば、脳内において発現しているセリンプロテアーゼとしては、組織型プラスミノゲンアクチベーター (Sappiro, A-D., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwent, A., and Vassalli, J-D., J. Clin. Invest., 92, 679-685, 1993)、トロンビン (Monard, D. Trends Neurosci., 11, 541-544, 1988)、ヒトトリプシンIV (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Müller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)、ニューロプシン (Chen, Z-L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and

Shiosaka, S., *J. Neurosci.*, 15(7), 5088-5097, 1995)、ニューロシン (Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., Tsujimoto, M., Yamamura, Y., Tanaka, T., Nakazato, H., and Yamaguchi, N., *Biochim. Biophys. Acta*, 1350, 11-14, 1997)などが知られている。

これら脳内におけるセリンプロテアーゼは、ニューロンの神経突起の伸展に関与するばかりでなく、標的ニューロンとのシナプス形成過程に関与していることが想定されている (Liu, Y., Fields, R. D., Fitzgerald, S., Festoff, B. W., and Nelson, P. G., *J. Neurobiol.*, 25, 325, 1994)。

しかしながら、これらセリンプロテアーゼの脳内における生理機能についてはほとんど解明されていない。また、脳内に発現し重要な生理機能を担うセリンプロテアーゼがその他多数存在することが予想されるがその多くは特定されていないのが現状である。

一方、凝固線溶補体系のある種のセリンプロテアーゼタンパク質は、クリングルドメイン、EGF-like構造、フィンガー構造、 γ -carboxyglutamic acidドメインならびにアップルドメインなどの構造をN末端側に有している (Furie, B., and Furie, B. C., *Cell*, 53, 505-518, 1988)。例えば、クリングルドメインを持つセリンプロテアーゼタンパク質としてはウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミノーゲンなどが知られている。

クリングルドメインは、フィブリン、ヘパリンおよびリシンアナログとの結合能を有し (Scanu, A. M. and Edelstein, C., *Biochimica. Biophysica. Acta*, 1256, 1-12, 1995)、血液線溶系においては、析出したフィブリンにプラスミノーゲンアクチベーターがクリングルドメインを介して結合し、近傍に結合したプラスミンを活性化することが示されている。さらに、血管新生抑制因子アンジオスタチンが

、プラスミノーゲン分子中のクリングルドメインであることが明らかとなり (Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Scaller, J., Marti, D., Söndel, S., McCance, S. G., O'Reilly, M. S., Llinás, M., and Folkman, J., *J. Biol. Chem.*, 271, 29461-29467, 1996)、クリングルドメイン構造単独の生理活性が初めて示された。

また、マクロファージスカベンジャーレセプターにおいて認められたスカベンジャーレセプターシステインリッチ (S R C R) ドメイン構造を有する一連のタンパク質群として、サイクロフィリンC結合蛋白質、スペラクト (S p e r a c t) レセプター、コンプリメントファクターI、CD5、CD6などの存在が知られている (Resnick, D., Pearson, A., and Krieger, M., *Trends. Biochem. Sci.*, 19, 5-8, 1994)。

サイクロフィリンC結合蛋白質やコンプリメントファクターIは分泌タンパク質であるのに対して、スペラクト (S p e r a c t) レセプターやCD5およびCD6は、膜結合型タンパク質であることが知られている。このうち、膜結合型タンパク質CD6と結合するタンパク質が活性化白血球接着分子 (A L C A M) であることが見い出され、CD6のS R C Rドメイン構造に結合位置があることがわかった (Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W., and Aruffo, A. J. *Biol. Chem.*, 270, 18187-18190, 1995)。

さらに、CD6のリガンドであるA L C A Mは、活性化リンパ球やニューロンに発現していることが知られており、CD6は、A L C A Mとの相互作用を介して免疫系や神経系における恒常性の維持に一定の制御機能を果たしていることが推察される。

このように、複数のドメイン構造を有するタンパク質は、各ドメインが固有の機能を有するばかりでなく、各ドメインの機能が連関

して特異的な認識機能を持って機能しているものと考えられている。

発明の開示

本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼDNAを提供することにある。さらに、本発明は当該DNAを用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該セリンプロテアーゼまたはそれをコードするDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、脳内に発現するセリンプロテアーゼをコードするcDNAに良く保存されている領域をプローブとして用い、5'翻訳領域が特徴的なcDNAをスクリーニングすることにより、新規機能タンパク質をコードするcDNAを単離し、本発明を完成させるに至った。

従って本発明は、(1)図7～12(配列番号：6)に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(2)図7～12(配列番号：6)に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼ

ドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(3) 図7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(4) 図7～12 (配列番号: 6) に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ (SRCR) ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチドを提供する。

本発明はさらに、(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを提供する。

本発明はさらに、(6) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードするDNAを提供する。

本発明はさらに、(7) 前記(5)又は(6)に記載のDNAを含んでなる発現ベクターを提供する。

本発明はさらに、(8)前記(7)に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はさらに、(9)前記(8)に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法を提供する。

本発明はさらに、(10)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体を提供する。

本発明はさらに、(11)前記(1)から(4)のいずれかに記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記(5)または(6)に記載のDNAを用いる生理活性物質のスクリーニング方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図2はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図3はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図4はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図5はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図6はマウス・セリンプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 7 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 8 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 9 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 0 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 1 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 2 はヒト・セリンプロテアーゼをコードする c D N A の塩基配列の一部分、及びそれに対応するアミノ酸配列を示す。

図 1 3 は、マウスの各臓器におけるセリンプロテアーゼ遺伝子の転写を示す Northern blotting の結果を示す電気泳動図である。

発明の実施の形態

マウスセリンプロテアーゼをコードする c D N A のクローニングは、先ず、常法に従って単離調製したマウス脳由来 m R N A から c D N A ライブラリーを作製し、次に、作製した c D N A ライブラリーをセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインした P C R プライマーを用いた P C R により行なった。ここで得られた P C R 産物をプローブとして、5' 翻訳領域が長く新規機能タンパク質をコードすると予想されるクローンのスクリーニングを実施した。

その結果、本発明者らは、マウス B S S P - 3 と命名した 2. 7 kb の c D N A を単離することに成功した。得られた c D N A 配列を常法により調べた結果、マウス B S S P - 3 c D N A は、セリンプロテアーゼドメインばかりでなくクリングルドメインならびにス

カベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。単離したマウスBSSP-3 cDNAは、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。具体例を実施例1に記載する。

次に、単離したマウスBSSP-3 cDNA全長をプローブとして、マウス各臓器およびマウス脳各部位におけるマウスBSSP-3 mRNAの発現を確認したところ、マウス各臓器においては、特に脳に強い発現を認め、肺および腎臓においても発現を認めた。また、マウス脳各部位においては、大脳および脳幹に強い発現を認め、延髄においても発現を認めた。その大きさはいずれの場合においても約2.7 kbの大きさのみであった。検討した脳各部位のうち、マウスBSSP-3 mRNAの発現は小脳では認められなかった。具体例を実施例2に記載する。このことから、マウスBSSP-3 mRNAは、実際にマウス臓器で発現していることが確認された。

さらに、マウスBSSP-3 cDNAをプローブにしてヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、ヒトBSSP-3 cDNAを単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒトBSSP-3 cDNAがマウスBSSP-3 cDNAの一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。具体例を実施例3に記載する。さらに、本発明者は、ヒトBSSP-3 cDNAのうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードするDNAをCOS-1細胞で発現したところ、

明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。具体例を実施例 4 に記載する。

以上の結果から、今回単離したマウスおよびヒト B S S P - 3 c D N A は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼドメイン、新規クリンゲルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードしていることばかりでなく、セリンプロテアーゼドメインが酵素活性を持った機能タンパク質であることが明らかとなった。

本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、その複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウス B S S P - 3 c D N A およびマウス B S S P - 3 c D N A がコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒト B S S P - 3 c D N A およびヒト B S S P - 3 c D N A がコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手法を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。

その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療

も可能である。

以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードするDNAのヌクレオチド配列として図1～6（配列番号：3）および図7～12（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼのDNAはこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAを得るには、実施例に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードするDNAは、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

例えば、実施例1に示すようなDNA（ヌクレオチド）プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によりクローニングすることができる。

本発明のDNAはさらにセリンプロテアーゼ活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。また、ハイブリダイゼーションの一般的方法は当業者においてよく知られており（例えば、実験医学臨時増刊号、羊土社、“バイオテクノロジー実験法シリーズ遺伝子工学総集編”、Vo

1. 5, No. 1 1, 2 4 - 6 0, 1 9 8 7)、活性測定もまた当業者によく知られている。

ゲノムからクローニングする場合、実施例において使用した種々のプライマーマヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている（Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章）。

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードするDNAはまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396 DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードするDNAは、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また図1～6（配列番号：3）または図7～12（配列番号：5）に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法（site-directed mutagenesis）等常法に従って得ることもできる（例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第8章を参照のこと）。

こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸

配列に1～複数のアミノ酸が付加されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から1～複数個のアミノ酸が除去されておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の1～複数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなおセリンプロテアーゼ活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型セリンプロテアーゼを設計し、それを製造することができる。

上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明のセリンプロテアーゼとのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数（例えば、マルトースバインディングプロテイン（*maltose-binding protein*）等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白や本セリンプロテアーゼに付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1～50、好ましくは、1～10の付加があげられる。

また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～30、好ましくは1～20、また、本セリンプロテアーゼの活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、セリンプロテアーゼ活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～10、好ましくは、1～5があげられる。

また、本発明においては、図1～6（配列番号：4）または図7

～ 1 2 (配列番号: 6) に示すそれぞれアミノ酸番号 5 1 7 から 7 6 1 までまたは 5 7 8 から 8 2 2 までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメイン、図 1 ～ 6 (配列番号: 4) または図 7 ～ 1 2 (配列番号: 6) に示すそれぞれアミノ酸番号 8 5 から 1 5 7 までまたは 4 0 から 1 1 2 までのアミノ酸配列からなるクリングルドメイン、または図 1 ～ 6 (配列番号: 4) または図 7 ～ 1 2 (配列番号: 6) に示すそれぞれアミノ酸番号 1 6 6 から 2 6 6 まで、番号 2 7 3 から 3 7 2 までもしくは番号 3 8 6 から 4 8 6 までまたは番号 1 1 7 から 2 1 7 まで、番号 2 2 7 から 3 2 7 まで、番号 3 3 4 から 4 3 3 まで、もしくは番号 4 4 7 から 5 4 7 までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ (S R C R) ドメインを提供し、これらドメインの作製は、後記する方法またはそれ自体公知のペプチド合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行うことができ、また本発明のドメインの活性を維持する変異型ドメインまたはそれをコードする DNA も同様に作製することができる。

上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインの DNA が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼまたはドメインを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインをコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物 (細胞又は培地) から目的とするセリンプロテアーゼまたはドメインを摂取する。

本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N 末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などの C₁-6。アシル化または欠失等がされた形で得られてもよ

い。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインの構造遺伝子5'側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例示としては、実施例4に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i)、バシルス属 (B a c i l l u s) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (B. s u b t i l i s) 等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエー (S. s e r e v i s i a e)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a)、キャベツルーパー細胞 (T r i c h o p l u s i a n i)、カイコ細胞 (B o m b y x m o r i)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1細胞、Vero細胞、CHO細胞、L細胞、ミエローマ細胞、C127細胞、BALB/c 3T3細胞、Sp-2/O細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞)) 等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択

され、例えば細菌用プロモーターとしては *l a c* プロモーター、*t r p* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、*a d h I* プロモーター、*p q k* プロモーター等が使用される。

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としては *S i m i a n V i r u s 4 0* の *e a r l y* もしくは *l a t e* プロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターまたは *S R α* プロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、*n e o* 遺伝子（G418耐性）等）等を含んでいるのを好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えばSV40のエンハンサー等を遺伝子上流または下流に挿入する。

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼまたはドメインの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインは、機能的タンパク質であることから、病態解析に有用な手段を提供し、本タンパク質を用いる生理活性物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプ

チド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の生理活性の測定を行なうことにより、例えばセリンプロテアーゼ阻害物質の場合は、実施例 4 と同様にして、行うことができる。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは前記したセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドをコードする DNA で形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記生理活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

また、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードする DNA は、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンスまたはアンチセンス法による遺伝子発現促進または抑制治療や生体内生理機能解明の有用な手段として提供され、解明された情報を基に新規医薬のスクリーニングにも用いられる。

さらにまた、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドまたはそれらをコードする DNA は、上記スクリーニング方法を実施する際に用いる形態でキットとして提供できる。

部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼまたはドメインについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼまたはドメインの切断により行なうことができる。

また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはその部分ペプチドを用いる生理活性物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドもしくはそれらをコードするDNAまたは該セリンプロテアーゼ、ドメインもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼ、ドメインおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。

なお、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化（グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等で）して用いることができる。また、該セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを用いる場合は、遺伝子発現促進または抑制を評価する手法、例えばルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を用いて、行うことができる。

実施例

実施例 1. プローブ用新規セリンプロテアーゼモチーフ cDNA のクローニング

(1) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

マウス脳mRNAの調製は、RTG-T-primed first-strand kit (Pharmacia) を用いて添付の文書に従って行った。得られたmRNA 5 μ l (約6 μ g) にオリゴdTプライマー 2 μ l (1 μ g) を加え、70°Cで10分間熱した後、水中で急冷した。

この熱変性mRNAに、4 μ lの5xFirst strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 37.5 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ lの10 mM dNTP, 2 μ lの0.1 M DTT, ジオチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水および5 μ l (1000 U) のSuper Script II RTを加え、37°Cで1時間反応させた。こうして得られたFirst strand cDNAをテンプレートとしてセリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCRを行なった。

プライマーとして、活性残基 (His) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys) を基に配列番号: 1に示すオリゴマーKY185 (5'-GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG-3') および活性残基 (Ser) 近傍のアミノ酸保存領域 (N-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu) を基に配列番号: 2に示すオリゴマーKY189 (3'-CCV CTR AGD CCN CCN GGC GA-5) をそれぞれ合成したものを用了。Taq DNA polymerase (Amersham社) を用いてPCRを行った後、PCR反応液をpCRIIベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。

(2) スクリーニング用マウス脳mRNAの単離精製

マウス脳mRNAの調製は、Fast Track mRNA

I s o l a t i o n k i t (I n v i t r o g e n 社) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、摘出したマウスの全脳に 15 ml の L y s i s B u f f e r を加え、テフロンホモジナイザーでただちにホモジナイズした。ホモジナイズした組織は、注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通したのち、50 ml の遠心管に入れ、45℃の水浴中で 1 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、4000 × g で 5 分間遠心して得られた上清を別の 50 ml の遠心管に入れ、そこに 5 M N a C l 溶液を 950 μ l 加えた後、再び注射筒を用いて 21 ゲージの注射針に 3 回通した。次に、この溶液にオリゴ (d T) セルロースを 1 錠加え、2 分間膨潤させた後、1 時間ゆっくり振動させた。1 時間後、2,000 × g で 5 分間遠心し、上清を吸引した後、20 ml の結合緩衝液に懸濁後、遠心した沈渣をさらに 10 ml の結合緩衝液で洗浄した。

次に、10 ml の低塩濃度洗浄液で 3 回洗浄した。最終洗浄後、オリゴ (d T) セルロースを 800 μ l の低塩濃度洗浄液に懸濁し、スピнкаラムに入れ、5000 × g で 10 秒間の遠心洗浄を 3 回繰り返した。洗浄後、200 μ l の溶離緩衝液を加え、5000 × g で 10 秒間の遠心を 2 回繰り返すことにより 400 μ l の m R N A 溶液を得た。m R N A 溶液から常法に従い、エタノール沈殿により m R N A を回収し、20 μ l の D E P C 処理した蒸留水に溶解した。

(3) c D N A ライブラリーからのスクリーニング

〈工程 1〉 c D N A の合成

実施例 1 (2) で得られた m R N A 5 μ l (約 6 μ g) にオリゴ d T N o t I プライマー 2 μ l (1 μ g) を加え、70℃で 10 分間熱した後、氷中で急冷した。この熱変性 m R N A に、4 μ l の

5 x 第一鎖緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ l の 10 mM dNTP, 2 μ l の 0.1 M DTT, DEPC 処理した蒸留水および 5 μ l (1000 U) の Super Script II RT を加え、37 °C で 1 時間反応させた。

次に、この反応液に 91 μ l の DEPC 処理した蒸留水、30 μ l の 5 x 第二鎖緩衝液 (100 mM Tris-HCl pH 6.9, 450 mM KCl, 23 mM MgCl₂, 0.75 mM β -NAD⁺, 50 mM (NH₄)₂SO₄), 3 μ l の 10 mM dNTP, 1 μ l (10 U) の大腸菌 DNA リガーゼ、4 μ l (40 U) の大腸菌 DNA ポリメラーゼおよび 1 μ l (2 U) の大腸菌 RNase H を加え、16 °C で 2 時間反応後、2 μ l (10 U) の T4 DNA ポリメラーゼを加え 16 °C で 5 分間反応させた。

さらに、この溶液に 10 μ l の 0.5 M EDTA を加えて混合した後、150 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌後 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 μ l の 5 M KOAc, 400 μ l のエタノールを加え攪拌し、15,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 500 μ l の 70 % エタノールで洗い、軽く風乾後、25 μ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

〈工程 2〉 EcoRI アダプターの付加

前工程で得られた 2 本鎖 cDNA 25 μ l に 10 μ l の 5 x T4 DNA 連結緩衝液 (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v), PEG 8000), EcoRI アダプター溶液 10

μ l (10 μ g) および 5 μ l (5 U) の T4 DNA ligase を加え、16℃にて16時間反応後、50 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌後 15,000 rpm で5分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5 μ l の 5 M KOAc, 125 μ l のエタノールを加え攪拌し、-80℃, 20分間冷却後、15,000 rpm で10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200 μ l の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、40 μ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

〈工程 3〉 λ gt 10 とのライゲーション

サイズ分画した cDNA 溶液 3 ml に λ gt 10 (EcoRI 切断) 1 μ l (50 ng) を加え、11 μ l の DEPC 処理した蒸留水、4 μ l の 5×T4 DNA 連結緩衝液、1 μ l の 5×T4 DNA リガーゼを加え室温で3時間反応させた。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 抽出を行い、5 μ l (5 μ g) の yeast tRNA, 5 μ l の 5 M KOAc および 125 μ l のエタノールを加え攪拌し、-80℃ 20分間冷却後、15,000 rpm で10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を 200 μ l の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、5 μ l の TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解した。

〈工程 4〉 パッケージング

工程 3 で得られたライゲーション後 cDNA を Gigapack Packaging Extracts (Stratagene) を用いてパッケージングした。すなわち、0.1 μ g/ μ l のライゲーション後 cDNA 溶液 1 μ l にキット添付の Freeze-thaw Extract 10 μ l を加えた後、さらに、キット

添付の Sonic Extract 15 μ l を直ちに加えよく攪拌した。室温で2時間放置後、500 μ l のファージ希釈緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.01%ゼラチン) を加え、さらに、20 μ l のクロロホルムを加えた。よく混和した後、室温で15000 rpm, 5分間遠心した上清を回収し、ファージ液を得た。常法に従い、このファージ液はタイトレーション後、宿主大腸菌に感染させた。

〈工程5〉ライブラリーのスクリーニング

実施例1(1)で得られたDNA断片を BcaBest DNA labeling kit (Takara) を用いて α -³²P dCTP で標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、前工程で得られた約40万クロンの cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、約40万個のクロンから、挿入DNA断片の最も長いクロン pUC18/mBSSP-3/1-1 を得た。

pUC18/mBSSP-3/1-1 の cDNA の全長は2,597塩基対で、244塩基対の5'非翻訳領域、2283塩基対の翻訳領域、70塩基対の3'非翻訳領域から成り、その翻訳領域はセリンプロテアーゼドメイン(アミノ酸番号:517~761)をコードするばかりでなくクリングルドメイン(アミノ酸番号:85~157)ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン(アミノ酸番号 ドメイン1:166-266、ドメイン2:273-372、ドメイン3:386~486)を含む新規機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。pUC18/mBSSP-3/1-1 の cDNA の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図1~6(配列番号:3)に示した。

実施例 2. mBSSP-3 の Northern blotting による発現部位の検討

マウス脳の total RNA は、トリゾル試薬（ライフテクノロジー）を用いて添付の文書に従って調製した。すなわち、マウスの大脳、脳幹、小脳および延髄を摘出したのちポリトロンでただちにホモジナイズし、組織容量の 10 倍量（約 3 ml）のトリゾル試薬を加えることにより組織を溶解した。さらに、クロロホルム 600 μ l を加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心した。遠心後、水相を回収し、回収した水相に 1500 μ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した。

得られたマウスの脳の各部位の全 RNA の沈殿を 400 μ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した後、常法に従いメンブランフィルターにブロットした。次に、pUC18/mBSSP-3/1-1 を制限酵素 EcoRI で消化し、約 2.7 kbp の DNA 断片を単離・精製し、前述の方法で α - 32 P dCTP で標識することによりプローブを作製した。

このプローブを前述のマウス脳各部位から調製した total RNA をブロットしたメンブランフィルターおよび市販の各種臓器から調製した mRNA をブロットしたメンブランフィルター（クロンテック社）と 55°C で一晩ハイブリダイズさせた後、それぞれのメンブランフィルターを 0.1% SDS を含む 2xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate) で室温、20 分間、続いて、0.1xSSC, 0.1% SDS に替え 65°C, 30 分間で 2 回洗い、BAS2000 用イメージングプレート（富士写真フィルム）に 30 分間露光させた。

その結果を図 13 に示した。各臓器の発現では、脳、肺および腎

臓で発現していることが確認された。脳の各部位では、大脳および脳幹で強い発現を認め、また、延髄でも弱い発現を認めたが、小脳での発現は認められなかった。発現は、いずれの場合も約 2.7 kb p の大きさのみであった。

実施例 3. ヒト BSSP-3 cDNA のクローニング

ヒト脳 cDNA ライブラリーは、クロンテック社より購入した。マウス BSSP-3 cDNA 断片をグルタルアルデヒドを用いて蛍光標識し、プローブを作製した。このプローブを用い、約 40 万クローンのヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、pUC18/hBSSP-3 を得た。

pUC18/hBSSP-3 cDNA の翻訳領域は、マウス BSSP-3 cDNA と同様にセリンプロテアーゼドメイン（アミノ酸番号：578～822）をコードするばかりでなくクリングルドメイン（アミノ酸番号：40～112）ならびにスカベンジャーレセプターシステインリッチドメイン（アミノ酸番号 ドメイン 1：117～217、ドメイン 2：227～327、ドメイン 3：334～433、ドメイン 4：447～547）を含む機能タンパク質をコードしていることが明らかとなった。

しかしながら、マウス BSSP-3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインがマウス BSSP-3 では 3 つであるのに対して、ヒト BSSP-3 は 4 つであることが明らかとなった。pUC18/hBSSP-3 の塩基配列および対応するアミノ酸配列を図 7～12（配列番号：5）に示す。

実施例 4. ヒト BSSP-3 cDNA がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

(1) 発現プラスミドの構築

pUC18/hBSSP-3のDNA断片とpdKCRベクターDNA断片を常法に従いライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼhBSSP-3発現プラスミドpdKCR/hBSSP-3を得た。

次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI、3'側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。これらプライマーを用い、pCR/TrypsinIIプラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。同様に、ヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNAの上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにデザインしたプライマーを用い、pdKCR/hBSSP-3をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で消化後、DNA断片を単離・精製した。

次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とヒトBSSP-3の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で前消化したpdKCR/hBSSP-3ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質変換させた。形質変換したコロニーのうち目的とするキメラDNAを含むコロニーをPCR法により確認し、発現プラスミド(pdKCR/Trip-hBSSP-3)を得た。

(2) COS-1細胞における発現

実施例4(1)で作製したキメラ遺伝子DNAをリポフェクシン

(Life Technologies) を用いて COS-1 細胞にトランスフェクションした。すなわち、直径 10 cm の培養用ディッシュ (Corning, 430167) に 10 % ウシ胎児血清を含むダルベコの最少必須培地 (DMEM, 日水製薬) で COS-1 細胞を 5×10^5 細胞植え込んだ。翌日、Opti-MEM 培地 (Life Technologies) 5 ml で細胞をリンスした後、新しい 5 ml の Opti-MEM 培地を加え、37 °C で 2 時間培養した。

培養後、ディッシュ 1 枚あたり、上述のプラスミド 1 μ g およびリポフェクチン 5 μ g の混液を加え、37 °C で 5 時間培養した。培養後、Opti-MEM 培地を 5 ml 加え、合計 10 ml とし、37 °C で 72 時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。また、コントロールとして、発現プラスミド p d K C R のみを COS-1 細胞にトランスフェクションした培養上清も調製した。

(3) 酵素活性の測定

実施例 4 (2) で得られた培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、COS-1 細胞の培養上清 45 μ l にエンテロキナーゼ (10 mg/ml, Biozyme Laboratories) 5 μ l を混和し、37 °C で 2 時間反応させた。次に、DMSO に溶解した合成基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (ペプチド研究所) を 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 で希釈した 0.2 mM 基質溶液を 50 μ l 加え、4 °C で 16 時間反応させた。反応後、励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm における蛍光を測定した。その結果、Trp-h B S S P-3 を発現した COS-1 細胞の培養上清をエンテロキナーゼ消化した時にのみ、酵素活性を認めた。

以上の結果から、ヒト B S S P-3 のセリンプロテアーゼドメイ

ンは、酵素活性を持つ機能タンパク質であることが明らかとなった。

発明の効果

本発明者らは、マウス脳 cDNA ライブラリーから新規セリンプロテアーゼドメインばかりでなく新規クリングルドメインならびに新規スカベンジャーレセプターシステインリッチドメインを含む新規機能タンパク質をコードするマウス BSSP-3 cDNA を単離した。単離したマウス BSSP-3 cDNA は、1つのクリングルドメイン、3つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていた。また、単離したマウス BSSP-3 mRNA の発現部位の検討結果から、本発明者らは、マウス BSSP-3 mRNA が脳に強く発現していること、脳のうち特に大脳および脳幹で強く発現していることを明らかにした。

次に、マウス BSSP-3 cDNA をプローブにして、ヒト脳 cDNA ライブラリーからヒト BSSP-3 cDNA を単離することに成功した。その結果、本発明者らは、ヒト BSSP-3 cDNA がマウス BSSP-3 cDNA の一次構造から予想されるものとは明らかに異なり、1つのクリングルドメイン、4つのスカベンジャーレセプターシステインリッチドメインおよび1つのセリンプロテアーゼドメインをコードしていることを明らかにした。

さらに本発明者らは、ヒト BSSP-3 cDNA のうちセリンプロテアーゼ成熟タンパク質をコードする DNA を COS-1 細胞で発現したところ、明らかに酵素活性を持つ機能タンパク質であることを明らかにした。本発明における新規機能タンパク質は、一次構造上複合的な機能を有することが明らかであるばかりでなく、そ

の複合的な機能を通して脳内の生理機能に一定の役割を果たしている。したがって、本発明のマウスBSSP-3 cDNAおよびマウスBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種マウス疾患モデルの病態解析に有用な手段を提供するものである。

また、病態解析を通じて得られた疾患治療のための有用な情報を基に、本発明のヒトBSSP-3 cDNAおよびヒトBSSP-3 cDNAがコードしている新規機能タンパク質は、各種疾患治療剤をスクリーニングする手段を提供するものであり、さらに実際のヒト疾患治療薬の開発に適用することも可能である。その治療法としては、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療が挙げられる。

さらに、新規機能タンパク質の各ドメイン構造のそれぞれは、単独で機能することもまた可能である。したがって、各ドメイン構造を個別に発現させた後、各ドメイン構造と相互作用を示す分子を特定することができる。また、特定した分子群の疾患への関与を調べることにより、遺伝子組換え体投与による補充治療ならびにセンス又はアンチセンス法による遺伝子発現促進又は抑制治療も可能である。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：6に示すセリンプロテアーゼと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

2. 配列番号：6に示すアミノ酸番号578から822までのアミノ酸配列からなるセリンプロテアーゼドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるセリンプロテアーゼドメインまたはその部分ペプチド。

3. 配列番号：6に示すアミノ酸番号40から112までのアミノ酸配列からなるクリングルドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるクリングルドメインまたはその部分ペプチド。

4. 配列番号：6に示すアミノ酸番号117から217まで、番号227から327まで、番号334から433までまたは番号447から547までのアミノ酸配列からなるスカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインと同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1乃至複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を含んでなるSRCRドメインまたはその部分ペプチド。

5. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA。
6. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドをコードする DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチド活性を有するペプチドをコードする DNA。
7. 請求項 5 または 6 に記載の DNA を含んでなる発現ベクター。
8. 請求項 7 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。
9. 請求項 8 に記載の宿主を培養または飼育し、セリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを採取することを特徴とするセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドの製造法。
10. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインまたはそれらの部分ペプチドを抗原とする抗体。
11. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のセリンプロテアーゼ、ドメインもしくはそれらの部分ペプチドまたは請求項 5 または 6 に記載の DNA を用いる生理活性物質のスクリーニング方法。

Fig.1

CGAGGTGGGTGGAGTCCGGACTCCGGCTACAGAGCTCCTGGCGCTCATCGCCTCTGG	60
CTCCAGCCTTTGCTTCGCGGGCTGACCCCTTTGGTCCCGGTGATCCTCCAGCTGCCCC	120
CGGGGCTGGACACAGAGGGCGGCGGAGCGTGGGAGGGGCTCTAGGACTCTGCGCG	180
GCCCCGCCGCCCTCCGCGGGACCCGGAGCCAGCATGGACACACTCGGCGCGCGC	240
AGCC	244
ATGGCGCTCGCCCCGCTGCGTGGCTGTGATTTTAGGGGCACTGTCTGTAGTGGCC	301
MetAlaLeuAlaArgCysValLeuAlaValIleLeuGlyAlaLeuSerValValAla	19
CGCGTGATCCGGTCTCGCGCTCTCCCCCTTCACCGCCCGCATCCGTCCCCACCGGTTCC	361
ArgAlaAspProValSerArgSerProLeuHisArgProHisProSerProProArgSer	39
CAACACGGCACTACCTTCCCAGCTCGCGGCGGCCACCCAGGACCCCGCGCTTCCCGCTC	421
GlnHisAlaHisTyrLeuProSerSerArgArgProProArgThrProArgPheProLeu	59
CCGCTCGGATCCCCGCTGCCCCAGCGCCCCGAGGTCTCTAGCACCGGGCACACGCCCCCG	481
ProLeuArgIleProAlaAlaGlnArgProGlnValLeuSerThrGlyHisThrProPro	79
ACGATTCCACGCCGCTCGGGGCAGGAGAGTCGTGGGGCAATGCCACCAACCTCGGCGTC	541
ThrIleProArgArgCysGlyAlaGlyGluSerTrpGlyAsnAlaThrAsnLeuGlyVal	99
CCGTGTCTACACTGGGACGAGGTGCCGCCCTTCTTGAGCGGTGCCCCCGCCAGTTGG	601
ProCysLeuHisTrpAspGluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrp	119

Fig.2

GCTGAGCTCGAGGGCAGCCGCACAACTTCTGCCGAGCCCGATGGCTCGGGCAGACCT	661
AlaGluLeuArgGlyGlnProHisAsnPheCysArgSerProAspGlySerGlyArgPro	139
TGGTGCTTCTATCGGAATGCCCAGGGCAAAGTAGACTGGGGCTACTGCCGATTGTGGTCAA	721
TrpCysPheTyrArgAsnAlaGlnGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysGlyGln	159
GGCCCGCGTGTGCCCGTCATTCCGCCCTTGTGGTGGGAACAGTGGGCATGAAGTCGAGTG	781
GlyProAlaLeuProValIleArgLeuValGlyGlyAsnSerGlyHisGluGlyArgVal	179
GAGCTGTACCAACGCTGGCCAGTGGGGGACCATCTGTGACGACCAATGGGACAAATGCAGAC	841
GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlnTrpAspAsnAlaAsp	199
GCAGACGTCACTGTAGGCAGCTGGGGCTCAGTGGCATTGCCCAAAGCATGGCATCAGGCA	901
AlaAspValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla	219
CATTTGGGGAAGGATCTGGCCCAATATTGTTGGATGAAGTACGCTGCCACCGGAAACGAG	961
HisPheGlyGluGlySerGlyProIleLeuLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu	239
CTGTCAATTGAGCAATGTCCAAAGAGTTCTCTGGGGCGGAACATAACTGTGGCCATAAAGAA	1021
LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu	259

Fig.3

GATGCTGGAGTGTCTTGTGTTCCCTTAACAGATGGTGTCTATCAGACTGGCAGGAGGAAAA	1081
AspAlaGlyValSerCysValProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys	279
AGTACCCATGAAGTCGCCCTGGAGGCTCTACTACAAGGGGCAGTGGGGGACAGTCTGTGAT	1141
SerThrHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrLysGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp	299
GATGGCTGGACTGAGATGAACACATACGTGGCTTGTCTGACTGCTGGGATTTAAATACGGC	1201
AspGlyTrpThrGluMetAsnThrTyrValAlaCysArgLeuLeuGlyPheLysTyrGly	319
AAACAGTCCTCTGTGAACCATTTTGATGGCAGCAACAGGCCCATATGGCTGGATGACGTC	1261
LysGlnSerSerValAsnHisPheAspGlySerAsnArgProIleTrpLeuAspAspVal	339
AGCTGCTCAGGAAAAGAAAGTCAGCTTCATTTCAGTGTTCAGGAGACAGTGGGGAAGGCAT	1321
SerCysSerGlyLysGluValSerPheIleGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis	359
GACTGCAGCCATAGAGAAAGATGTGGGCTCACCTGCTATCCTGACAGCGATGGACATAGG	1381
AspCysSerHisArgGluAspValGlyLeuThrCysTyrProAspSerAspGlyHisArg	379
CTTTCTCCAGGTTTCCCATCAGACTAGTGGATGGAGAGAAATAAGAAAGGACGAGTG	1441
LeuSerProGlyPheProIleArgLeuValAspGlyGluAsnLysLysGluGlyArgVal	399

Fig.4

GAGGTTTTGTCAATGGCCAATGGGGAACAATCTGCCGATGACGGATGGACCGATAAGCAT	1501
GluValPheValAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysHis	419
GCAGCTGTGATCTGCCGGCAGCTTGGCTATAAGGGTCTTCCAGAGCAAGACTATGGCT	1561
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	439
TATTTTGGGGAAGGAAAAGGCCCCATCCACATGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAATGAG	1621
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisMetAspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	459
AAGGCCCTGGCTGACTGTGTCAAAACAAGACATTGGAAGGCACAACACTGCCGCCACAGTGAG	1681
LysAlaLeuAlaAspCysValLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	479
GATGCAGGAGTCATCTGTGACTATTTAGAGAAGAAAGCATCAAGTAGTGGTAAATAAGAG	1741
AspAlaGlyValIleCysAspTyrLeuGluLysLysAlaSerSerSerGlyAsnLysGlu	499
ATGCTCTCATCTGGATGTGGACTGAGGTTACTGCACCCGTCGGCAGAGAAACGGATCATTTGGT	1801
MetLeuSerSerGlyCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	519
GGGAACAATTCTTTAAGGGGTGCCTTGGCAGGCTTCCCTCAGGCTGAGGTCGGCC	1861
GlyAsnAsnSerLeuArgGlyAlaTrpProTrpGlnAlaSerLeuArgLeuArgSerAla	539

Fig.5

CATGGAGACGGCAGGCTGCTTTGTGGAGCTACCCCTTCTGAGTAGCTGCTGGGTCCTGACA 1921
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr 559

GCTGCACACTGCTTCAAAAGGTACGGAACAACTCGAGGAGCTATGCAGTTCGAGTTGGG 1981
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnAsnSerArgSerTyrAlaValArgValGly 579

GATTATCACTCTGGTACCAGAGGAGTTTGAACAAGAAATAGGGTTCAACAGATTGTG 2041
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGlnGluIleGlyValGlnGlnIleVal 599

ATTCACAGGAACTACAGGCCAGACAGAACGACTATGACATTGCCCTGGTTAGATTGCAA 2101
IleHisArgAsnTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln 619

GGACCAGGGAGCAATGTGCCAGACTAAGCACCCACGTTTGGCCAGCCTGTTACCTCTA 2161
GlyProGlyGluGlnCysAlaArgLeuSerThrHisValLeuProAlaCysLeuProLeu 639

TGGAGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCCTCCAACGTGTCACATAACAGGATGGGGAGACACA 2221
TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysHisIleThrGlyTrpGlyAspThr 659

GGTCGTGCCTACTCAAGAACTCTACAACAAGCTGTGTGCCTCTGTTACCCAAAGAGGTTT 2281
GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaValProLeuLeuProLysArgPhe 679

Fig.6

TGTAAGAGAGGTACAAGGACTATTTACTGGGAGAAATGCTCTGTGCTGGGAACCTCCAA	2341
CysLysGluArgTyrLysGlyLeuPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuGln	699
GAAGACAACCGTGTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGTGGAGGACCACCTCATGTGTGAAAAG	2401
GluAspAsnArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluLys	719
CCTGATGAGTCCTGGGTTGTGTATGGGGTGACTTCCTGGGGGTATGGATGTGGAGTCAAA	2461
ProAspGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys	739
GACACTCCTGGAGTTTATACCAGAGTCCCCGCCCTTTGTACCTTGGATAAAAAGTGCACC	2521
AspThrProGlyValTyrThrArgValProAlaPheValProTrpIleLysSerValThr	759
AGTCTGTAACCTTATGGAAAGCTCAAGAAAAATAGTAAACAGTAACCATTCAGTCTTCATA	2581
SerLeu**	761
CTTGGCACCATGCCAGAAAAAATAAAAAA	2614

Fig.7

CCGACGACGGTCCGCGCGCCCTCTCCCGCGCTTCCCGCGCCCCCGCGGGCGTCCCT	60
ProThrThrArgProProProProLeuProProArgPheProArgProProArgAlaLeuPro	20
GCCAGCGCCCGCACGCCCTCCAGCGCGGCACACGCCCCCGCGCCGACCCCTGGGGCTGC	120
AlaGlnArgProHisAlaLeuGlnAlaGlyHisThrProArgProHisProTrpGlyCys	40
CCCGCCGGCAGCCATGGGTCAGCGTGACGGACTTCGGCGCCCCCGTGTCTGCGGTGGCG	180
ProAlaGlyGluProTrpValSerValThrAspPheGlyAlaProCysLeuArgTrpAla	60
GAGGTGCCACCCCTTCCTGGAGCGGTGCGCCCCCAGCGAGCTGGGCTCAGCTGCGAGGACAG	240
GluValProProPheLeuGluArgSerProProAlaSerTrpAlaGlnLeuArgGlyGln	80
CGCCACAACCTTTTGTCGGAGCCCCCGACGGCGCGGCAGACCCCTGGTGTTCTACGGAGAC	300
ArgHisAsnPheCysArgSerProAspGlyAlaGlyArgProTrpCysPheTyrGlyAsp	100
GCCCGTGGCAAGGTGGACTGGGGCTACTGCGACTGCAGACACGGATCAGTACGACTTCGT	360
AlaArgGlyLysValAspTrpGlyTyrCysAspCysArgHisGlySerValArgLeuArg	120
GGCGGCAAAAATGAGTTTGAAGGCACAGTGGAAGTATATGCAAGTGGAGTTTGGGGCACT	420
GlyGlyLysAsnGluPheGluGlyThrValGluValTyrAlaSerGlyValTrpGlyThr	140

Fig.8

GTCTGTAGCAGCCACTGGGATGATTCTGTATGCATCAGTCAATTTGTCCACCAGCTGCAGCTG 480
 ValCysSerSerHisTrpAspSerAspAlaSerValIleCysHisGlnLeuGlnLeu 160

 GGAGGAAAGGAATAGCAAAACAAACCCCGTTTCTGGACTGGGCCCTTATCCCATTTAT 540
 GlyGlyLysGlyIleAlaLysGlnThrProPheSerGlyLeuGlyLeuIleProIleTyr 180

 TGGAGCAATGTCCCGTTGCCGAGGAGATGAAGAAAATATACTGCTTTGTGAAAAAGACATC 600
 TrpSerAsnValArgCysArgGlyAspGluGluAsnIleLeuLeuCysGluLysAspIle 200

 TGGCAGGGTGGGTGTCTCCTCAGAAAGATGGCAGCTGCTGTACCGTGTAGCTTTTCCCAT 660
 TrpGlnGlyGlyValCysProGlnLysMetAlaAlaValThrCysSerPheSerHis 220

 GGCCCAACGTTCCCCCATCATTCGCCCTTGCTGGAGGCAGCAGTGTGCATGAAGCGCGGTG 720
 GlyProThrPheProIleIleArgLeuAlaGlyGlySerSerValHisGluGlyArgVal 240

 GAGCTCTACCATGCTGCCCAGTGGGGAACCGTTTGTGATGACCAATGGGATGATGCCCGAT 780
 GluLeuTyrHisAlaGlyGlnTrpGlyThrValCysAspGlnTrpAspAlaAsp 260

 GCAGAAGTGATCTGCAGGCAGCTGGGCCCTCAGTGGCATTGCCAAAGCATGGCATCAGGCA 840
 AlaGluValIleCysArgGlnLeuGlyLeuSerGlyIleAlaLysAlaTrpHisGlnAla 280

Fig.9

TATTTTGGGAAGGTCTGCCCCAGTTATGTTGGATGAAGTACGCTGCACTGGGAATGAG 900
 TyrPheGlyGluGlySerGlyProValMetLeuAspGluValArgCysThrGlyAsnGlu 300

 CTTTCAATTGACAGTGTCCTCCAAAGAGCTCCTGGGAGAGCATAACTGTGCCATAAAGAA 960
 LeuSerIleGluGlnCysProLysSerSerTrpGlyGluHisAsnCysGlyHisLysGlu 320

 GATGCTGAGTGTCCTGTACCCCTCTAACAGATGGGTTCATCAGACTTGCAGGTGGGAAA 1020
 AspAlaGlyValSerCysThrProLeuThrAspGlyValIleArgLeuAlaGlyGlyLys 340

 GGCAGCCATGAGGGTCGCTTGAGGTATATTACAGAGGCCAGTGGGAACTGTCTGTGAT 1080
 GlySerHisGluGlyArgLeuGluValTyrTyrArgGlyGlnTrpGlyThrValCysAsp 360

 GATGGCTGGACTGAGCTGAATACATACGTGGTTTGTTCGACAGTTGGGATTTAAATATGGT 1140
 AspGlyTrpThrGluLeuAsnThrTyrValValCysArgGlnLeuGlyPheLysTyrGly 380

 AAACAAGCATCTGCCAACCATTTTGAAGAAAGCACAGGGCCCATATGGTTGGATGACGTC 1200
 LysGlnAlaSerAlaAsnHisPheGluGluSerThrGlyProIleTrpLeuAspVal 400

 AGCTGCTCAGGAAAGAAACCAGATTCTTTCAGTGTTCAGGCCGACAGTGGGGAAGGCAT 1260
 SerCysSerGlyLysGluThrArgPheLeuGlnCysSerArgArgGlnTrpGlyArgHis 420

Fig.10

GACTGCAGCCACCGAAGATGTTAGCATTCCTGCTACCTCGCGGCGGACACAGG	1320
AspCysSerHisArgGluAspValSerIleAlaCysTyrProGlyGlyGluGlyHisArg	440
CTCTCTCTGGGTTTCCCTGTCAGACTGATGGATGGAGAAAAATAAGAAAGACGAGTG	1380
LeuSerLeuGlyPheProValArgLeuMetAspGlyGluAsnLysLysGlyArgVal	460
GAGGTTTTTATCAATGGCCAGTGGGAAACAATCTGTGATGATGGACTGGATAAGGAT	1440
GluValPheIleAsnGlyGlnTrpGlyThrIleCysAspAspGlyTrpThrAspLysAsp	480
GCAGCTGTGATCTGTCGTCAGCTTGGCTACAAAGGTCTCTGCCAGAGCAAGAACCATGGCT	1500
AlaAlaValIleCysArgGlnLeuGlyTyrLysGlyProAlaArgAlaArgThrMetAla	500
TACTTTGGAGAGGAAAAGGACCCATCCATGTGGATAATGTGAAGTGCACAGGAAATGAG	1560
TyrPheGlyGluGlyLysGlyProIleHisValaspAsnValLysCysThrGlyAsnGlu	520
AGGTCCCTGGCTGACTGTATCAAGCAAGATATTGGAAAGACACAACTGCCCGCCACAGTGAA	1620
ArgSerLeuAlaAspCysIleLysGlnAspIleGlyArgHisAsnCysArgHisSerGlu	540
GATGCAGGAGTTATTTGTGATTATTTGGCAAGAGGCCCTCAGGTAACAGTAATAAAGAG	1680
AspAlaGlyValIleCysAspTyrPheGlyLysLysAlaSerGlyAsnSerAsnLysGlu	560

Fig.11

TCCCTCTCATCTGTTTGTGGCTTGAGATTACTGCACCGTCGGCAGAAAGCGGATCATTTGGT	1740
SerLeuSerSerValCysGlyLeuArgLeuLeuHisArgArgGlnLysArgIleIleGly	580
GGGAAAATTCTTAAGGGTGGTTGGCCCTTGGCAGGTTTCCCTCCGGCTGAAGTCATCC	1800
GlyLysAsnSerLeuArgGlyGlyTrpProTrpGlnValSerLeuArgLeuLysSerSer	600
CATGGAGATGGCAGGCTCCTCTGCGGGGCTACGCTCCTGAGTAGCTGCTGGGTCCTCACA	1860
HisGlyAspGlyArgLeuLeuCysGlyAlaThrLeuLeuSerSerCysTrpValLeuThr	620
GCAGCACACTGTTTCAAGAGGTATGGCAACAGCACTAGAGCTATGCTGTTAGGGTTGGA	1920
AlaAlaHisCysPheLysArgTyrGlyAsnSerThrArgSerTyrAlaValArgValGly	640
GATTATCATACTCTGGTACCAGAGGAGTTTGAGGAAGAAATTGGAGTTCAACAGATTGTG	1980
AspTyrHisThrLeuValProGluGluPheGluGluIleGlyValGlnGlnIleVal	660
ATTTCATCGGGAGTATCGACCCGACCGCAGTGATTATGACATAGCCCCCTGGTTAGATTACAA	2040
IleHisArgGluTyrArgProAspArgSerAspTyrAspIleAlaLeuValArgLeuGln	680
GGACCAGAAGAGCAATGTGCCAGATTCAGCAGCCATGTTTGGCCAGCCTGTTTACCACCTC	2100
GlyProGluGluGlnCysAlaArgPheSerSerHisValLeuProAlaCysLeuProLeu	700

Fig.12

TGGAGAGAGGCCACAGAAAACAGCATCCAACTGTTACATAACAGGATGGGGTGACACA 2160
 TrpArgGluArgProGlnLysThrAlaSerAsnCysTyrIleThrGlyTrpGlyAspThr 720

 GGACGAGCCTATTCAAGAACACTACAACAAGCAGCCATTCCCCTTACTTCTTAAAGGTTT 2220
 GlyArgAlaTyrSerArgThrLeuGlnGlnAlaAlaIleProLeuLeuProLysArgPhe 740

 TGTGAAGAACGTTATAAGGTCGGTTTACAGGGAGAAATGCTTTGTGCTGGAACCTCCAT 2280
 CysGluGluArgTyrLysGlyArgPheThrGlyArgMetLeuCysAlaGlyAsnLeuHis 760

 GAACACAAACGCTGGACAGCTGCCAGGGAGACAGCGGAGGCCACTCATGTGTGAACGG 2340
 GluHisLysArgValAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuMetCysGluArg 780

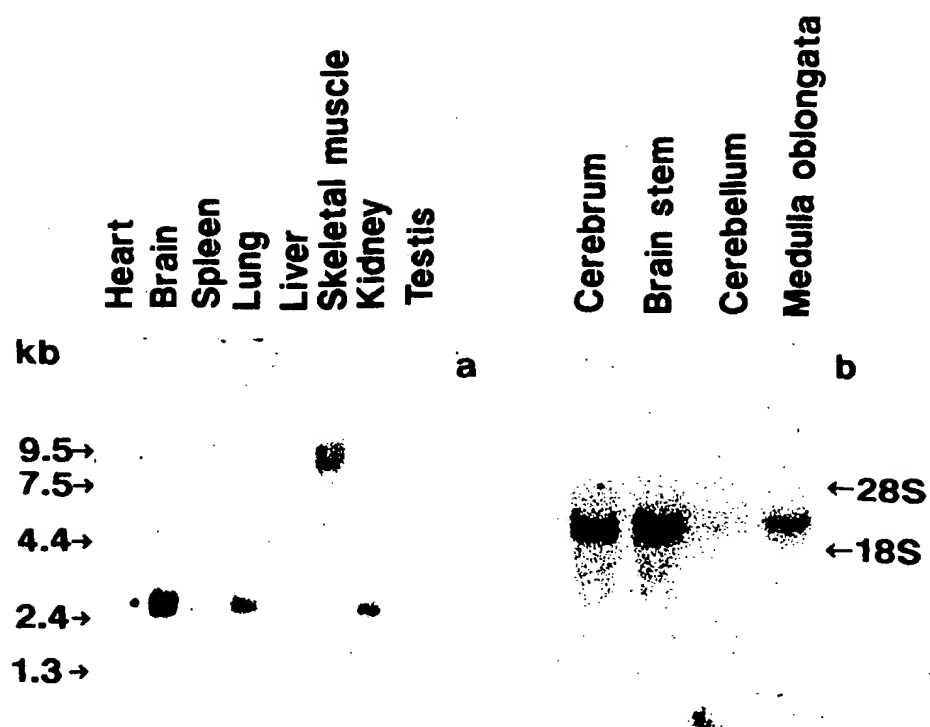
 CCCGGAGAGAGCTGGTGGTGTATGGGGTGACCTCCTGGGGGTATGGCTGTGGAGTCAAG 2400
 ProGlyGluSerTrpValValTyrGlyValThrSerTrpGlyTyrGlyCysGlyValLys 800

 GATTCTCCTGGTGTATTATACCAAAGTCTCAGCCTTTGTACCTTGGATAAAAAGTGCACC 2460
 AspSerProGlyValTyrThrLysValSerAlaPheValProTrpIleLysSerValThr 820

 AAACGTGAATTCTTCATGGAAAACCTTCAAAGCAGCATTTAAACAAATGGAAAACTTTGAAC 2520
 LysLeu*** 822

 CCCCACATTAGCACTCAGCAGAGATGACAAACAAACGGCAAG 2562

Fig.13



配 列 表

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > Suntory Limited
< 1 2 0 > Novel Serine Protease
< 1 3 0 > STY-F867/PCT
< 1 4 0 >
< 1 4 1 >
< 1 5 0 >
< 1 5 1 > 1997-07-24
< 1 6 0 > 6
< 2 1 0 > 1
< 2 1 1 > 20
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > Synthetic DNA
< 4 0 0 > 1
GTGCTCACNG CNGCBCAYTG
< 2 1 0 > 2
< 2 1 1 > 20
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 3 > Synthetic DNA
< 4 0 0 > 2
AGCGGNCCNC CDGARTCVCC
< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2614

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Mouse

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 3

cgaggggtggg gtggaggtcg gactccgggc tacagagctc ctggcgctca tcgcctctgg 60

ctccagcctt tgcttcgcgg ggctgaccct ttgggtcccg gtgtgatcct ccagctgccc 120

cgggggctgg gacagcaggg cggcggcgcg agcgtgggag ggggctctag gactctgccg 180

gccccgcccc gccccctccg cgggggacccg gagcccagca tggaccacac tcggcgccgc 240

agcc atg gcg ctc gcc cgc tgc gtg ctg gct gtg att tta ggg gca ctg 289

Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

tct gta gtg gcc cgc gct gat ccg gtc tcg cgc tct ccc ctt cac cgc 337

Ser Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg

20 25 30

ccg cat ccg tcc cca ccg cgt tcc caa cac gcg cac tac ctt ccc agc 385

Pro His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser

35 40 45

tcg cgg cgg cca ccc agg acc ccg cgc ttc ccg ctc ccg ctg cgg atc 433

Ser Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile

50 55 60

ccc gct gcc cag cgc ccg cag gtc ctc agc acc ggg cac acg ccc ccg 481

Pro Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro

65 70 75

-acg att cca cgc cgc tgc ggg gca gga gag tgc tgg ggc aat gcc acc	529
Thr Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr	
80 85 90 95	
aac ctc ggc gtc ccg tgt cta cac tgg gac gag gtg ccg ccc ttc ctg	577
Asn Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu	
100 105 110	
gag cgg tgc ccc ccg gcc agt tgg gct gag ctg cga ggg cag ccg cac	625
Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His	
115 120 125	
aac ttc tgc cgg agc ccg gat ggc tgc ggc aga cct tgg tgc ttc tat	673
Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr	
130 135 140	
cgg aat gcc cag ggc aaa gta gac tgg ggc tac tgc gat tgt ggt caa	721
Arg Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln	
145 150 155	
ggc ccg gcg ttg ccc gtc att cgc ctt gtt ggt ggg aac agt ggg cat	769
Gly Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His	
160 165 170 175	
gaa ggt cga gtg gag ctg tac cac gct ggc cag tgg ggg acc atc tgt	817
Glu Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys	
180 185 190	
gac gac caa tgg gac aat gca gac gca gac gtc atc tgt agg cag ctg	865
Asp Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu	
195 200 205	
ggg ctc agt ggc att gcc aaa gca tgg cat cag gca cat ttt ggg gaa	913
Gly Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu	
210 215 220	

gga tct ggc cca ata ttg ttg gat gaa gta cgc tgc acc gga aac gag 961
 Gly Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu
 225 230 235
 ctg tca att gag caa tgt cca aag agt tcc tgg ggc gaa cat aac tgt 1009
 Leu Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys
 240 245 250 255
 ggc cat aaa gaa gat gct gga gtg tct tgt gtt cct cta aca gat ggt 1057
 Gly His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly
 260 265 270
 gtc atc aga ctg gca gga gga aaa agt acc cat gaa ggt cgc ctg gag 1105
 Val Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu
 275 280 285
 gtc tac tac aag ggg cag tgg ggg aca gtc tgt gat gat ggc tgg act 1153
 Val Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr
 290 295 300
 gag atg aac aca tac gtg gct tgt cga ctg ctg gga ttt aaa tac ggc 1201
 Glu Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly
 305 310 315
 aaa cag tcc tct gtg aac cat ttt gat ggc agc aac agg ccc ata tgg 1249
 Lys Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp
 320 325 330 335
 ctg gat gac gtc agc tgc tca gga aaa gaa gtc agc ttc att cag tgt 1297
 Leu Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys
 340 345 350
 tcc agg aga cag tgg gga agg cat gac tgc agc cat aga gaa gat gtg 1345
 Ser Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val
 355 360 365

-ggc ctc acc tgc tat cct gac agc gat gga cat agg ctt tct cca ggt 1393
 Gly Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly
 370 375 380
 ttt ccc atc aga cta gtg gat gga gag aat aag aag gaa gga cga gtg 1441
 Phe Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val
 385 390 395
 gag gtt ttt gtc aat ggc caa tgg gga aca atc tgc gat gac gga tgg 1489
 Glu Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp
 400 405 410 415
 acc gat aag cat gca gct gtg atc tgc cgg cag ctt ggc tat aag ggt 1537
 Thr Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly
 420 425 430
 cct gcc aga gca agg act atg gct tat ttt ggg gaa gga aaa ggc ccc 1585
 Pro Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro
 435 440 445
 atc cac atg gat aat gtg aag tgc aca gga aat gag aag gcc ctg gct 1633
 Ile His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala
 450 455 460
 gac tgt gtc aaa caa gac att gga agg cac aac tgc cgc cac agt gag 1681
 Asp Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu
 465 470 475
 gat gca gga gtc atc tgt gac tat tta gag aag aaa gca tca agt agt 1729
 Asp Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser
 480 485 490 495
 ggt aat aaa gag atg ctc tca tct gga tgt gga ctg agg tta ctg cac 1777
 Gly Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His
 500 505 510

... cgt cgg cag aaa cgg atc att ggt ggg aac aat tct tta agg ggt gcc 1825
 Arg Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala
 515 520 525
 tgg cct tgg cag gct tcc ctc agg ctg agg tcg gcc cat gga gac ggc 1873
 Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly
 530 535 540
 agg ctg ctt tgt gga gct acc ctt ctg agt agc tgc tgg gtc ctg aca 1921
 Arg Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr
 545 550 555
 gct gca cac tgc ttc aaa agg tac gga aac aac tcg agg agc tat gca 1969
 Ala Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala
 560 565 570 575
 gtt cga gtt ggg gat tat cat act ctg gta cca gag gag ttt gaa caa 2017
 Val Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln
 580 585 590
 gaa ata ggg gtt caa cag att gtg att cac agg aac tac agg cca gac 2065
 Glu Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp
 595 600 605
 aga agc gac tat gac att gcc ctg gtt aga ttg caa gga cca ggg gag 2113
 Arg Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu
 610 615 620
 caa tgt gcc aga cta agc acc cac gtt ttg cca gcc tgt tta cct cta 2161
 Gln Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro leu
 625 630 635
 tgg aga gag agg cca cag aaa aca gcc tcc aac tgt cac ata aca gga 2209
 Trp Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly
 640 645 650 655

tgg gga gac aca ggt cgt gcc tac tca aga act cta caa caa gct gct 2257
 Trp Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala
 660 665 670
 gtg cct ctg tta ccc aag agg ttt tgt aaa gag agg tac aag gga cta 2305
 Val Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu
 675 680 685
 ttt act ggg aga atg ctc tgt gct ggg aac ctc caa gaa gac aac cgt 2353
 Phe Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg
 690 695 700
 gtg gac agc tgc cag gga gac agt gga gga cca ctc atg tgt gaa aag 2401
 Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys
 705 710 715
 cct gat gag tcc tgg gtt gtg tat ggg gtg act tcc tgg ggg tat gga 2449
 Pro Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly
 720 725 730 735
 tgt gga gtc aaa gac act cct gga gtt tat acc aga gtc ccc gcc ttt 2497
 Cys Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe
 740 745 750
 gta cct tgg ata aaa agt gtc acc agt ctg taacttatgg aaagctcaag 2547
 Val Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu
 755 760
 aaaatagtaa aacagtaacc attcagtctt catacttggc accatgccag aaaaaaaaaa 2607
 aaaaaaa 2614
 < 2 1 0 > 4
 < 2 1 1 > 761
 < 2 1 2 > PRT
 < 2 1 3 > Mouse

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 4

Met Ala Leu Ala Arg Cys Val Leu Ala Val Ile Leu Gly Ala Leu Ser

1 5 10 15

Val Val Ala Arg Ala Asp Pro Val Ser Arg Ser Pro Leu His Arg Pro

20 25 30

His Pro Ser Pro Pro Arg Ser Gln His Ala His Tyr Leu Pro Ser Ser

35 40 45

Arg Arg Pro Pro Arg Thr Pro Arg Phe Pro Leu Pro Leu Arg Ile Pro

50 55 60

Ala Ala Gln Arg Pro Gln Val Leu Ser Thr Gly His Thr Pro Pro Thr

65 70 75 80

Ile Pro Arg Arg Cys Gly Ala Gly Glu Ser Trp Gly Asn Ala Thr Asn

85 90 95

Leu Gly Val Pro Cys Leu His Trp Asp Glu Val Pro Pro Phe Leu Glu

100 105 110

Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Glu Leu Arg Gly Gln Pro His Asn

115 120 125

Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ser Gly Arg Pro Trp Cys Phe Tyr Arg

130 135 140

Asn Ala Gln Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys Gly Gln Gly

145 150 155 160

Pro Ala Leu Pro Val Ile Arg Leu Val Gly Gly Asn Ser Gly His Glu

165 170 175

Gly Arg Val Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp

180 185 190

Asp Gln Trp Asp Asn Ala Asp Ala Asp Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly
 195 200 205
 Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala His Phe Gly Glu Gly
 210 215 220
 Ser Gly Pro Ile Leu Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu
 225 230 235 240
 Ser Ile Glu Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly
 245 250 255
 His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ser Cys Val Pro Leu Thr Asp Gly Val
 260 265 270
 Ile Arg Leu Ala Gly Gly Lys Ser Thr His Glu Gly Arg Leu Glu Val
 275 280 285
 Tyr Tyr Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu
 290 295 300
 Met Asn Thr Tyr Val Ala Cys Arg Leu Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys
 305 310 315 320
 Gln Ser Ser Val Asn His Phe Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ile Trp Leu
 325 330 335
 Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Val Ser Phe Ile Gln Cys Ser
 340 345 350
 Arg Arg Gln Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Gly
 355 360 365
 Leu Thr Cys Tyr Pro Asp Ser Asp Gly His Arg Leu Ser Pro Gly Phe
 370 375 380
 Pro Ile Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu
 385 390 395 400

Val Phe Val Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr
 405 410 415
 Asp Lys His Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro
 420 425 430
 Ala Arg Ala Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile
 435 440 445
 His Met Asp Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Lys Ala Leu Ala Asp
 450 455 460
 Cys Val Lys Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp
 465 470 475 480
 Ala Gly Val Ile Cys Asp Tyr Leu Glu Lys Lys Ala Ser Ser Ser Gly
 485 490 495
 Asn Lys Glu Met Leu Ser Ser Gly Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg
 500 505 510
 Arg Gln Lys Arg Ile Ile Gly Gly Asn Asn Ser Leu Arg Gly Ala Trp
 515 520 525
 Pro Trp Gln Ala Ser Leu Arg Leu Arg Ser Ala His Gly Asp Gly Arg
 530 535 540
 Leu Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala
 545 550 555 560
 Ala His Cys Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Ser Arg Ser Tyr Ala Val
 565 570 575
 Arg Val Gly Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Gln Glu
 580 585 590
 Ile Gly Val Gln Gln Ile Val Ile His Arg Asn Tyr Arg Pro Asp Arg
 595 600 605

Ser Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Gly Glu Gln

610

615

620

Cys Ala Arg Leu Ser Thr His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro leu Trp

625

630

635

640

Arg Glu Arg Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys His Ile Thr Gly Trp

645

650

655

Gly Asp Thr Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Val

660

665

670

Pro Leu Leu Pro Lys Arg Phe Cys Lys Glu Arg Tyr Lys Gly Leu Phe

675

680

685

Thr Gly Arg Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu Gln Glu Asp Asn Arg Val

690

695

700

Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Lys Pro

705

710

715

720

Asp Glu Ser Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys

725

730

735

Gly Val Lys Asp Thr Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Pro Ala Phe Val

740

745

750

Pro Trp Ile Lys Ser Val Thr Ser Leu

755

760

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 2562

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Human

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 5

ccg acg acg cgt ccg ccg ccg cct ctc ccg cgc ttc ccg cgc ccc ccg 48
 Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro
 1 5 10 15
 cgg gcg ctc cct gcc cag cgc ccg cac gcc ctc cag gcc ggg cac acg 96
 Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr
 20 25 30
 ccc cgg ccg cac ccc tgg ggc tgc ccc gcc ggc gag cca tgg gtc agc 144
 Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser
 35 40 45
 gtg acg gac ttc ggc gcc ccg tgt ctg cgg tgg gcg gag gtg cca ccc 192
 Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro
 50 55 60
 ttc ctg gag cgg tcg ccc cca gcg agc tgg gct cag ctg cga gga cag 240
 Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln
 65 70 75 80
 cgc cac aac ttt tgt cgg agc ccc gac ggc gcg ggc aga ccc tgg tgt 288
 Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys
 85 90 95
 ttc tac gga gac gcc cgt ggc aag gtg gac tgg ggc tac tgc gac tgc 336
 Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys
 100 105 110
 aga cac gga tca gta cga ctt cgt ggc ggc aaa aat gag ttt gaa ggc 384
 Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly
 115 120 125
 aca gtg gaa gta tat gca agt gga gtt tgg ggc act gtc tgt agc agc 432
 Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser
 130 135 140

cac tgg gat gat tct gat gca tca gtc att tgt cac cag ctg cag ctg 480
 His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 gga gga aaa gga ata gca aaa caa acc ccg ttt tct gga ctg ggc ctt 528
 Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu
 165 170 175
 att ccc att tat tgg agc aat gtc cgt tgc cga gga gat gaa gaa aat 576
 Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn
 180 185 190
 ata ctg ctt tgt gaa aaa gac atc tgg cag ggt ggg gtg tgt cct cag 624
 Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln
 195 200 205
 aag atg gca gct gct gtc acg tgt agc ttt tcc cat ggc cca acg ttc 672
 Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe
 210 215 220
 ccc atc att cgc ctt gct gga ggc agc agt gtg cat gaa ggc cgg gtg 720
 Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val
 225 230 235 240
 gag ctc tac cat gct ggc cag tgg gga acc gtt tgt gat gac caa tgg 768
 Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp
 245 250 255
 gat gat gcc gat gca gaa gtg atc tgc agg cag ctg ggc ctc agt ggc 816
 Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly
 260 265 270
 att gcc aaa gca tgg cat cag gca tat ttt ggg gaa ggg tct ggc cca 864
 Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro
 275 280 285

ggt atg ttg gat gaa gta cgc tgc act ggg aat gag ctt tca att gag	912
Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu	
290 295 300	
cag tgt cca aag agc tcc tgg gga gag cat aac tgt ggc cat aaa gaa	960
Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu	
305 310 315 320	
gat gct gga gtg tcc tgt acc cct cta aca gat ggg gtc atc aga ctt	1008
Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu	
325 330 335	
gca ggt ggg aaa ggc agc cat gag ggt cgc ttg gag gta tat tac aga	1056
Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg	
340 345 350	
ggc cag tgg gga act gtc tgt gat gat ggc tgg act gag ctg aat aca	1104
Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr	
355 360 365	
tac gtg gtt tgt cga cag ttg gga ttt aaa tat ggt aaa caa gca tct	1152
Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser	
370 375 380	
gcc aac cat ttt gaa gaa agc aca ggg ccc ata tgg ttg gat gac gtc	1200
Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val	
385 390 395 400	
agc tgc tca gga aag gaa acc aga ttt ctt cag tgt tcc agg cga cag	1248
Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln	
405 410 415	
tgg gga agg cat gac tgc agc cac cgc gaa gat gtt agc att gcc tgc	1296
Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys	
420 425 430	

tac cct ggc ggc gag gga cac agg ctc tct ctg ggt ttt cct gtc aga	1344
Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg	
435 440 445	
ctg atg gat gga gaa aat aag aaa gaa gga cga gtg gag gtt ttt atc	1392
Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile	
450 455 460	
aat ggc cag tgg gga aca atc tgt gat gat gga tgg act gat aag gat	1440
Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp	
465 470 475 480	
gca gct gtg atc tgt cgt cag ctt ggc tac aag ggt cct gcc aga gca	1488
Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala	
485 490 495	
aga acc atg gct tac ttt gga gaa gga aaa gga ccc atc cat gtg gat	1536
Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp	
500 505 510	
aat gtg aag tgc aca gga aat gag agg tcc ttg gct gac tgt atc aag	1584
Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys	
515 520 525	
caa gat att gga aga cac aac tgc cgc cac agt gaa gat gca gga gtt	1632
Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val	
530 535 540	
att tgt gat tat ttt ggc aag aag gcc tca ggt aac agt aat aaa gag	1680
Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu	
545 550 555 560	
tcc ctc tca tct gtt tgt ggc ttg aga tta ctg cac cgt cgg cag aag	1728
Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys	
565 570 575	

cgg atc att ggt ggg aaa aat tct tta agg ggt ggt tgg cct tgg cag 1776
 Arg Ile Ile Gly Gly Lys Asn Ser Leu Arg Gly Gly Trp Pro Trp Gln
 580 585 590
 gtt tcc ctc cgg ctg aag tca tcc cat gga gat ggc agg ctc ctc tgc 1824
 Val Ser Leu Arg Leu Lys Ser Ser His Gly Asp Gly Arg Leu Leu Cys
 595 600 605
 ggg gct acg ctc ctg agt agc tgc tgg gtc ctc aca gca gca cac tgt 1872
 Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
 610 615 620
 ttc aag agg tat ggc aac agc act agg agc tat gct gtt agg gtt gga 1920
 Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Ser Thr Arg Ser Tyr Ala Val Arg Val Gly
 625 630 635 640
 gat tat cat act ctg gta cca gag gag ttt gag gaa gaa att gga gtt 1968
 Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Glu Glu Ile Gly Val
 645 650 655
 caa cag att gtg att cat cgg gag tat cga ccc gac cgc agt gat tat 2016
 Gln Gln Ile Val Ile His Arg Glu Tyr Arg Pro Asp Arg Ser Asp Tyr
 660 665 670
 gac ata gcc ctg gtt aga tta caa gga cca gaa gag caa tgt gcc aga 2064
 Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Glu Glu Gln Cys Ala Arg
 675 680 685
 ttc agc agc cat gtt ttg cca gcc tgt tta cca ctc tgg aga gag agg 2112
 Phe Ser Ser His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Leu Trp Arg Glu Arg
 690 695 700
 cca cag aaa aca gca tcc aac tgt tac ata aca gga tgg ggt gac aca 2160
 Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Asp Thr
 705 710 715 720

gga cga gcc tat tca aga aca cta caa caa gca gcc att ccc tta ctt 2208
 Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu
 725 730 735
 cct aaa agg ttt tgt gaa gaa cgt tat aag ggt cgg ttt aca ggg aga 2256
 Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg
 740 745 750
 atg ctt tgt gct gga aac ctc cat gaa cac aaa cgc gtg gac agc tgc 2304
 Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys
 755 760 765
 cag gga gac agc gga gga cca ctc atg tgt gaa cgg ccc gga gag agc 2352
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser
 770 775 780
 tgg gtg gtg tat ggg gtg acc tcc tgg ggg tat ggc tgt gga gtc aag 2400
 Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys
 785 790 795 800
 gat tct cct ggt gtt tat acc aaa gtc tca gcc ttt gta cct tgg ata 2448
 Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile
 805 810 815
 aaa agt gtc acc aaa ctg taattcttca tggaaacttc aaagcagcat 2496
 Lys Ser Val Thr Lys Leu
 820
 ttaaacaat ggaaaacttt gaacccccac tattagcact cagcagagat gacaacaaac 2556
 ggcaag 2562
 < 2 1 0 > 6
 < 2 1 1 > 822
 < 2 1 2 > PRT
 < 2 1 3 > Human

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 6

Pro Thr Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu Pro Arg Phe Pro Arg Pro Pro

1 5 10 15

Arg Ala Leu Pro Ala Gln Arg Pro His Ala Leu Gln Ala Gly His Thr

20 25 30

Pro Arg Pro His Pro Trp Gly Cys Pro Ala Gly Glu Pro Trp Val Ser

35 40 45

Val Thr Asp Phe Gly Ala Pro Cys Leu Arg Trp Ala Glu Val Pro Pro

50 55 60

Phe Leu Glu Arg Ser Pro Pro Ala Ser Trp Ala Gln Leu Arg Gly Gln

65 70 75 80

Arg His Asn Phe Cys Arg Ser Pro Asp Gly Ala Gly Arg Pro Trp Cys

85 90 95

Phe Tyr Gly Asp Ala Arg Gly Lys Val Asp Trp Gly Tyr Cys Asp Cys

100 105 110

Arg His Gly Ser Val Arg Leu Arg Gly Gly Lys Asn Glu Phe Glu Gly

115 120 125

Thr Val Glu Val Tyr Ala Ser Gly Val Trp Gly Thr Val Cys Ser Ser

130 135 140

His Trp Asp Asp Ser Asp Ala Ser Val Ile Cys His Gln Leu Gln Leu

145 150 155 160

Gly Gly Lys Gly Ile Ala Lys Gln Thr Pro Phe Ser Gly Leu Gly Leu

165 170 175

Ile Pro Ile Tyr Trp Ser Asn Val Arg Cys Arg Gly Asp Glu Glu Asn

180 185 190

Ile Leu Leu Cys Glu Lys Asp Ile Trp Gln Gly Gly Val Cys Pro Gln
 195 200 205
 Lys Met Ala Ala Ala Val Thr Cys Ser Phe Ser His Gly Pro Thr Phe
 210 215 220
 Pro Ile Ile Arg Leu Ala Gly Gly Ser Ser Val His Glu Gly Arg Val
 225 230 235 240
 Glu Leu Tyr His Ala Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gln Trp
 245 250 255
 Asp Asp Ala Asp Ala Glu Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Leu Ser Gly
 260 265 270
 Ile Ala Lys Ala Trp His Gln Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro
 275 280 285
 Val Met Leu Asp Glu Val Arg Cys Thr Gly Asn Glu Leu Ser Ile Glu
 290 295 300
 Gln Cys Pro Lys Ser Ser Trp Gly Glu His Asn Cys Gly His Lys Glu
 305 310 315 320
 Asp Ala Gly Val Ser Cys Thr Pro Leu Thr Asp Gly Val Ile Arg Leu
 325 330 335
 Ala Gly Gly Lys Gly Ser His Glu Gly Arg Leu Glu Val Tyr Tyr Arg
 340 345 350
 Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Thr Glu Leu Asn Thr
 355 360 365
 Tyr Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Phe Lys Tyr Gly Lys Gln Ala Ser
 370 375 380
 Ala Asn His Phe Glu Glu Ser Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asp Val
 385 390 395 400

Ser Cys Ser Gly Lys Glu Thr Arg Phe Leu Gln Cys Ser Arg Arg Gln
405 410 415

Trp Gly Arg His Asp Cys Ser His Arg Glu Asp Val Ser Ile Ala Cys
420 425 430

Tyr Pro Gly Gly Glu Gly His Arg Leu Ser Leu Gly Phe Pro Val Arg
435 440 445

Leu Met Asp Gly Glu Asn Lys Lys Glu Gly Arg Val Glu Val Phe Ile
450 455 460

Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Thr Asp Lys Asp
465 470 475 480

Ala Ala Val Ile Cys Arg Gln Leu Gly Tyr Lys Gly Pro Ala Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Met Ala Tyr Phe Gly Glu Gly Lys Gly Pro Ile His Val Asp
500 505 510

Asn Val Lys Cys Thr Gly Asn Glu Arg Ser Leu Ala Asp Cys Ile Lys
515 520 525

Gln Asp Ile Gly Arg His Asn Cys Arg His Ser Glu Asp Ala Gly Val
530 535 540

Ile Cys Asp Tyr Phe Gly Lys Lys Ala Ser Gly Asn Ser Asn Lys Glu
545 550 555 560

Ser Leu Ser Ser Val Cys Gly Leu Arg Leu Leu His Arg Arg Gln Lys
565 570 575

Arg Ile Ile Gly Gly Lys Asn Ser Leu Arg Gly Gly Trp Pro Trp Gln
580 585 590

Val Ser Leu Arg Leu Lys Ser Ser His Gly Asp Gly Arg Leu Leu Cys
595 600 605

Gly Ala Thr Leu Leu Ser Ser Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
610 615 620
Phe Lys Arg Tyr Gly Asn Ser Thr Arg Ser Tyr Ala Val Arg Val Gly
625 630 635 640
Asp Tyr His Thr Leu Val Pro Glu Glu Phe Glu Glu Glu Ile Gly Val
645 650 655
Gln Gln Ile Val Ile His Arg Glu Tyr Arg Pro Asp Arg Ser Asp Tyr
660 665 670
Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Gln Gly Pro Glu Glu Gln Cys Ala Arg
675 680 685
Phe Ser Ser His Val Leu Pro Ala Cys Leu Pro Leu Trp Arg Glu Arg
690 695 700
Pro Gln Lys Thr Ala Ser Asn Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly Asp Thr
705 710 715 720
Gly Arg Ala Tyr Ser Arg Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ile Pro Leu Leu
725 730 735
Pro Lys Arg Phe Cys Glu Glu Arg Tyr Lys Gly Arg Phe Thr Gly Arg
740 745 750
Met Leu Cys Ala Gly Asn Leu His Glu His Lys Arg Val Asp Ser Cys
755 760 765
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Glu Arg Pro Gly Glu Ser
770 775 780
Trp Val Val Tyr Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Val Lys
785 790 795 800
Asp Ser Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Phe Val Pro Trp Ile
805 810 815

WO 99/05290

PCT/JP98/03324

Lys Ser Val Thr Lys Leu

820

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p.143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p.386-392	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
31 August, 1998 (31. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
8 September, 1998 (08. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p. 143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p. 386-392	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.08.98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

印

4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/05290
PCT/JP98/03324

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi
A. Aoki & Associates
Toranomon 37 Mori Building
5-1, Toranomon 3-chome
Minato-ku
Tokyo 105-8423
JAPON

2



Date of mailing (day/month/year) 04 February 1999 (04.02.99)		
Applicant's or agent's file reference F867-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP98/03324	International filing date (day/month/year) 24 July 1998 (24.07.98)	Priority date (day/month/year) 24 July 1997 (24.07.97)
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 February 1999 (04.02.99) under No. WO 99/05290

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号

国際出願日

(交付印)

出願人又は代理人の寄附記号
(希望する場合、最大13字)

F 8 6 7 - P C T



第 I 欄 発明の名称

新規セリンプロテアーゼ

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は正式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

サントリー株式会社

SUNTORY LIMITED

〒530-8203 日本国大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, OSAKA 530-8203 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は正式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

鶴岡伸夫 TSURUOKA Nobuo

〒567-0827 日本国大阪府茨木市稲葉町18-7-501

18-7-501, Inaba-cho, Ibaraki-shi, OSAKA 567-0827 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が缺欄に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代領者、通知のため

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代領者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は正式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

弁理士 (7751) 石田 敬 ISHIDA Takashi

〒105-8423 日本国東京都港区虎ノ門三丁目5番1号

虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

A. AOKI & ASSOCIATES

Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku,

TOKYO 105-8423 JAPAN

電話番号:

03-5470-1900

ファクシミリ番号:

03-5470-1911

加入電信番号:

J 26282

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代領者が出席されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この紙面を使用しないときは、この用紙を縦書きに折り込むこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山城 恭子 YAMASHIRO Kyoko

〒569-0852 日本国大阪府高槻市北柳川町15-13-211

15-13-211, Kitayanagawa-cho, Takatsuki-shi, OSAKA 569-0852 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき、
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

山 口 希 YAMAGUCHI Nozomi

〒603-8146 日本国京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御盤口町
285-79

285-79, Shingoryoguchi-cho, Teramachinishi-iru, Kuramaguchi-tori,
Kita-ku, Kyoto-shi, KYOTO 603-8146 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき、
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき、
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は正式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したとき、
は、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の段に記載されている。

規則 4.9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する口に印を付すこと。少なくとも1つの口に印を付すこと)。

広域中等国

- ☐ **AP** **ARIPO** 中略 : **CH** ガーナ Ghana, **CM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ズンバウェ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **EA** ユーラシア中略 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア 特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EP** ヨーロッパ中略 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☐ **OA** **OAPI** 中略 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボワール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **ML** マリ Mali, **MR** モリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権条約のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の国類の指定又は最優いを求める場合には点線の上に記す)

国別中略 (他の国類の指定又は最優いを求める場合には点線の上に記す)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MX マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway |
| <input type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン
Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL シェラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE ジョージア Georgia | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> VN ヴイエトナム Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> ZW ズンバウェ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |

以下の口は、この様式の発行後に特許協力条約の締結国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

国類の指定の審査 : 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この審査から除外された国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が締結を条件としていること、並びに優先日から15日が経過する前にその締結がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 (国類の指定は、指定を特定する国類の提出と指定手数料及び優先料の納付からなる。この期限は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

1. 全ての情報を記載する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄……の続き」(欄番号を表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。特に、

 - (i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「氏名」を使用できないとき。

この場合は、「第何欄の続き」と表示し、第何欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。
 - (ii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しているとき。

この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。
 - (iii) 第II欄又は第III欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第II欄の続き」、「第III欄の続き」又は「第II欄及び第III欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。
 - (iv) 第IV欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第IV欄の続き」と表示し、第IV欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。
 - (v) 第V欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加記」を伴うとき、又は、米国の「補記」又は「一件補記」を伴うとき。

この場合は、「第V欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。
 - (vi) 第VI欄において優先権を主張する発明の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、第VI欄で求められている同じ情報を、それぞれの発明の出願について記載する。
 - (vii) 第VI欄において発明の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第VI欄の続き」と表示し、その発明の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その発明の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。
2. 出願人が、第V欄における複数の指定の宣言に關し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「複数の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。
3. 出願人が、指定宣言について不利にならない開示又は新設性の喪失についての例外に關する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新設性喪失の例外に關する請求」と表示し、以下にその内容を記述する。

IV 欄 の 続 き

氏 名	弁理士(8787) 福 本 積	FUKUMOTO Tsumoru
氏 名	弁理士(8826) 戸 田 利 雄	TODA Toshio
氏 名	弁理士(8289) 西 山 雅 也	NISHIYAMA Masaya
氏 名	弁理士(8133) 樋 口 外 治	HIGUCHI Sotoji
あて名	IV欄に記載のあて名に同じ The same address as Box IV	

第VI欄 優先権主張 ☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願 号	先 の 出 願		
		国内出願：国 名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 24. 07. 97	特願平9-213969号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☐ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証請求を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を通知欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。通知欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択	先の調査機関の利用請求：当該調査機関の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）
ISA/J P	出願日（日、月、年） 出願番号 国名（又は広域官庁）

第VIII欄 照会欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。
要約 5 枚 明細書（図表を除く） 28 枚 請求の範囲 2 枚 図面 13 枚 明細書の図表 22 枚 合 計 71 枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 要約計算用紙 2. <input checked="" type="checkbox"/> 添付する手続料に相当する特許印紙を貼付した書面 3. <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 4. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 5. <input type="checkbox"/> 優先権主張（上記第VI欄の()の番号を記載する） 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する） 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 8. <input checked="" type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク） 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（詳細を詳細に記載する） : 陳述書 フレキシブルディスクの記録形式等の 情報を記載した書面

契約書とともに提出する図面： 本国出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

本人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

石田 敬 戸田利雄 樋口外治
 福本 積 西山雅也

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	<input type="checkbox"/> 受理された
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	<input type="checkbox"/> 不足図面がある
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA/J P	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用紙を送付していない

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日
 形式PCT/RO/101（最終用紙）（1998年7月）

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F867-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/03324	国際出願日 (日.月.年) 24.07.98	優先日 (日.月.年) 24.07.97
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/57, C07K14/47, 16/40, C12N5/06, 9/64, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

REGISTRY (STN)

Swiss-Prot/PIR/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	KARL PROBA, THOMAS P. GSCHWEND, PETER SONDEREGGER, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human neurotrypsin", Biochimica et Biophysica Acta, 1998, Vol. 1396, No. 2, p. 143-147	1-11
A, P	YOSHIRO YAMAMURA, KYOKO YAMASHIRO, NOBUO TSURUOKA, HIROSHI NAKAZATO, ATSUSHI TSUJIMURA, NOZOMI YAMAGUCHI, "Molecular Cloning of a Novel Brain-Specific Serine Protease with a Kringle-like Structure and Three Scavenger Receptor Cysteine-Rich Motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 239, No. 2, p. 386-392	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.08.98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449